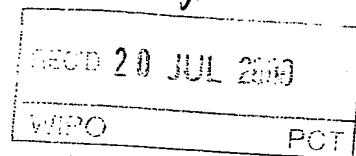


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



DE 00/1466

E.J.U.

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

199 23 074.9

**Anmeldetag:**

13. Mai 1999

**Anmelder/Inhaber:**

Karl Völker Stiftung an der Fachhochschule  
Mannheim, Mannheim/DE; Hajo S u h r  
Heidelberg/DE.

**Bezeichnung:**

Hochauflösendes Videomikroskop zur Ausmessung  
extrahierter Proben von Partikelsuspensionen mit  
eingepprägter mechanischer Probenschwingung

**IPC:**

G 01 N, G 02 B, C 12 M

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**



München, den 11. Juli 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*[Signature]*  
Weinmayer

## Beschreibung

Hochauflösendes Videomikroskop zur Ausmessung extrahierter  
Proben von Partikelsuspensionen mit eingepprägter mechanischer  
5 Probenschwingung.

- Die meßtechnische Erfassung und Charakterisierung von Partikeln in  
Probensuspensionen von geringer Größe stellt eine wichtige diagnostische  
Methode dar. Beispielsweise werden bei der Herstellung von Hefe oder auch  
10 beim Brauen von Bier Suspensionsproben aus den Fermentationsbehältern  
entnommen, die in verdünnter Form in standardisierten transparenten  
Meßkammern (Beispielsweise Thoma-Meßkammer) unter dem  
Labormikroskop betrachtet, zur Konzentrationsermittlung ausgezählt und  
bezüglich der Partikelgröße mit Hilfe automatischer Bildverarbeitung  
15 ausgemessen werden. Hierbei handelt es sich um eine Standardmethode in  
allen von Partikeln kontrollierten Prozessen, beispielsweise in der  
Biotechnologie oder in der chemischen Verfahrenstechnik, wo Stoffe in Form  
mikroskopischer Partikel in Reaktoren anfallen und charakterisiert werden  
müssen.
- 20 Auch in der Medizin fallen Blutproben in Milliliter bis Mikroliter-Volumina an,  
die in derselben Weise, eventuell unter Zuhilfenahme von Anfärbemethoden  
ausgewertet werden.
- Diese Erfindung löst zwei bisher auftretende Probleme bei der  
mikroskopischen Diagnose kleiner Suspensionmengen.
- 25 Erstens: Zur Auszählung in normierten Zählkammern unter dem  
Labormikroskop sind aufwendige und fehlerträchtige Verdünnungsschritte  
notwendig, bis eine zur visuellen oder automatischen Charakterisierung  
geeignete, stark verdünnte Probensuspension in einem kleinen  
Probevolumen von Mikrometer-Größenordnung hineinpräpariert ist. Jeder  
30 Verdünnungsschritt und die abschließende Einbringung in die Meßkammer  
riskieren Abweichungen von einer korrekten Auswertung. Manuelle Fehler,  
Adsorptionseffekte, osmotische Effekte, Sedimentationen und

Entmischungseffekte durch Strömungsbeschleunigungen können den repräsentativen Charakter der präparierten Partikel-Stichprobe zerstören. Zweitens: Die präparierte transparente Meßkammer muß präzise und stabil unter dem Mikroskop fixiert und fokussiert werden, damit weder

- 5 Bewegungsunschärfe durch Restströmung oder Vibrationsunruhe oder optische Defokussierung die visuelle oder automatische Bildauswertung stören. Dies stellt hohe Anforderungen an das Mikroskopstativ und die optischen Justiervorrichtungen.

- Selbst wenn die eigentliche Bildauswertung durch digitale Bildverarbeitung  
10 automatisiert wird, bleiben als kostenträchtige Nachteile die Erfordernisse eines aufwendigen Labormikroskops, einer volumenpräzisen Küvette und einer Fokussierung mit entsprechender Sorgfalt.

- Beide Probleme werden von der hier beschriebenen Erfindung umgangen.  
15 Erfindungsgemäß wird die Probe in scheinbarer Paradoxie zu den Erfordernissen einer hochauflösenden Mikroskopie durch elektromechanische oder magnetomechanische Hilfsmittel in beständige Unruhe und schnelle Bewegung versetzt. Dies bewirkt, daß sich die Probensuspension dauernd neu durchmischt, und daß sich keine  
20 Konzentrationsgradienten entwickeln können.

- Da mit gewöhnlichen Mikroskopen wegen der künstlich eingeprägten Unruhe hochauflösende mikroskopische Bilder aus der Suspension nicht mehr zu machen sind, benutzt man erfindungsgemäß ein hochauflösendes Videomikroskop mit extrem kurzen Belichtungszeiten von unter einer  
25 Mikrosekunde. Dieses Videomikroskop ist Stand der Technik im Bereich der inline Prozesskontrolle (Patent DE 40 32 002 C2 sowie der Artikel in "In Situ Microscopy for On Line Characterization of Cell Population in Bioreactors", Biotechnology & Bioengineering 47, 106-117 (1997) ) Die extrem kurze Belichtungszeit dieses Mikroskops von weniger als  
30 Mikrosekunden erlaubt scharfe Aufnahmen von bewegten mikroskopischen Partikeln in der mechanisch gerüttelten, in Schwingungen versetzten oder gerührten Probenküvette.

Weiterhin benötigt dieses Mikroskopiekonzept kein mechanisch begrenztes präzises Beobachtungsvolumen. Stattdessen kann man das virtuelle Volumen nutzen, daß sich durch die begrenzte Schärfentiefe der Objektivabbildung von selbst aus einer größeren Suspensionsumgebung

5 herausschält. Das beobachtete Meßvolumen begrenzt sich objektiv und reproduzierbar durch Anwendung ein numerischen Schärfenkriteriums im Algorithmus der automatischen Bildverarbeitung. Es kann mit definierten Eichsuspensionen kalibriert werden. Das kurz gepulste Videomikroskop erzeugt auszählbare und ausmeßbare Direktaufnahmen aus der künstlich

10 turbulent oder strömend gehaltenen Probensuspension. Die gezählten Objekte können durch Kalibrierung direkt als Maß der Partikelkonzentration interpretiert werden.

Durch eine transparente Küvettenwand werden eine größere Anzahl Bilder aufgenommen, beispielsweise einige hundert, die der automatischen

15 Bildverarbeitung zur Auszählung und Ausmessung der Partikelformen zugeleitet werden.

Damit die Durchmischung und Konzentration der Suspension auch gegen die Tendenz zur Entmischung durch Sedimentation und Adsorption erhalten bleibt, wird die Suspension durch miniaturisierte mechanische Rührer oder

20 durch aufgeprägte Rüttelleffekte durch magneto-mechanische oder elektro-mechanische Schwingungen in Bewegung gehalten. Beispielsweise ein mit Schwingungen beaufschlagter Piezokristall in Kontakt mit der Küvette kann zur nachhaltigen Durchmischung und Bewegung der Partikel dienen.

Die Anzahl aufgenommener Bilder ist proportional zur Größe der

25 statistischen Stichprobe, die in die sich aus der Bildinformation zusammensetzt. Dies gilt jedoch nur solange, wie garantiert ist, daß Szenen aufeinanderfolgende Bilder (d.h. die zufällig darin enthaltene Partikelsammlung) vollkommen unkorreliert sind. Das zur Auswertung herangezogene, scharf abgebildete virtuelle Probevolumen innerhalb der

30 Suspension muß seinen Inhalt also zwischen zwei Bildern vollständig austauschen. Eben dieser Zweck wird durch das erfindungsgemäße mechanische Rütteln an der Küvette ebenfalls erfüllt.

Folgende drei Hauptvorteile ergeben sich mit der erfindungsgemäß in

- 5 Unruhe versetzten Mikroskopierküvette unter einem gepulsten Videomikroskop:

- 1) Anspruchlose Probenbehälter: Auf eine volumenpräzise Probenkammer kann verzichtet werden, da durch die Bildverarbeitung ohnehin nur die scharf abgebildeten Partikel aus einem geringeren Teilvolumen der Küvette
 

10 zur Auswertung herausgefiltert werden und auf diese Weise ein virtuelles aber präzise kalibrierbares Probevolumen entsteht. Die automatische Bildverarbeitung zählt scharf abgebildete Zellen und erzeugt mit der mittleren Zählrate pro Bild ein kalibrierbares Signal der Anzahlkonzentration in der Suspension. Zusätzlich kann sie morphologische Details wie

15 Formfaktoren oder Größenhistogramme ermitteln.
- 2) Der Fokussierungsaufwand entfällt, weil das Mikroskop immer eine scharf abgebildete Schicht in der Suspension findet, wobei die unscharf abgebildeten Schichten durch die automatische Bildverarbeitung von der Auswertung ausgegrenzt werden. Es kann daher auch ohne aufwendige
 

20 Probenfixierung und ohne vibrationsarmes Mikroskopstativ scharfe Bilder aus der Suspension aufnehmen. Es entfällt auch die in der konventionellen Mikroskopie notwendige vibrationsarme Fixierung und Ruhigstellung der Präparate unter dem Mikroskop, denn der Bewegungsunschärfe unruhiger Partikel wird durch die extrem kurze Belichtungszeit elektronisch

25 ausgewichen.

Ein kostengünstiger einfacher mechanischer Aufbau ohne das herkömmliche teure justierbare Mikroskopstativ wird damit ermöglicht.
- 3) Vereinfachte Probenpräparierung: Die Notwendigkeit einer starken Verdünnung entfällt oder wird abgemildert, da das In Situ Mikroskop auch
 

30 auswertbare und kalibrierbare Bilder im Bereich sehr hoher Konzentrationen von beispielsweise über  $10^9$  Partikeln pro Kubikzentimeter bei 4 Mikrometern Partikeldurchmesser aufnimmt.

Bei vorhandenen Probenmengen im Milliliterformat ist die sorgfältige Präparierung repräsentativer winziger (und daher fehleranfälliger) Probevolumina von wenigen Mikrolitern nicht mehr notwendig, da die größeren Proben mit eingepprägter Präparatbewegung gut durchmischt bleiben und direkt aus ihnen repräsentative Bilder im gepulsten Videomikroskop erzeugt werden.

Insgesamt wird so erreicht, daß die mikroskopische Charakterisierung von Partikelparametern in geringen Probevolumina wesentlich vereinfacht, und kostengünstiger gestaltet werden kann.

Figur 1 zeigt eine beispielhafte Ausformung der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

15 Sie zeigt den Mikroskoptubus<sup>1</sup> mit Bildsensor 2 (Beispielsweise ein CCD-Frame) und mit Objektiv 3 und Sichtfenster 4 über einer transparenten quaderförmig konstruierten Probenküvette 5. Die Küvette sitzt auf einem Piezoring 6, welcher durch Elektrodenbeschichtung auf konventionelle Art elektrisch zu mechanischen Schwingungen angeregt werden kann.

20 Beaufschlagt man die Elektroden mit einer geeigneten elektrischen Wechselspannung<sup>8</sup>, kann man von niederfrequenten Schwingungen bis zum Ultraschall beliebige periodische Bewegungen in die Küvette einkoppeln und die Durchmischung der Suspension erzwingen.

Unter der Küvette im Zentrum des Piezoringes ist eine miniaturisierte Blitzlampe 7 - nötigenfalls mit Kondensoroptik - positioniert, die eine Durchlichtbelichtung der Bewegten Probe erzeugt. Vorteilhaft - weil kostengünstig - ist die Verwendung von gepulsten Luminiszenzdiolen.

## Ansprüche

1. Vorrichtung mit einem Videomikroskop zur mikroskopischen Abbildung  
5 von Partikeln wie beispielsweise biologische Zellen in Suspensionsproben  
oder Tröpfchen in Emulsionsproben,

gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale:

- Das Videomikroskop ist ein Mikroskop zur hochauflösenden Abbildung  
schnell bewegter mikroskopischer Partikel durch extrem kurze  
10 Belichtungspulse ( ca 1Mikrosekunde) beispielsweise durch gepulste  
Luminiszenzdiode
- der Probenbehälter der Suspension wird durch ein optisch transparentes  
Fenster vom Mikroskop eingesehen,
- die aufgrund der begrenzten Schärfentiefe der Objektivabbildung scharf  
15 abgebildete Suspensionsschicht bildet ein geringeres Teilvolumen des  
gesamten Suspensionpräparats,
- die Suspension wird durch magnetomechanische oder  
elektromechanische Hilfsmittel wie beispielsweise magnetische Rührer  
oder Piezo-Oszillatoren in Strömungsunruhe versetzt,
- 20 - die mechanisch induzierte Unruhe der Suspension erzeugt eine  
beständige Durchmischung der Suspension und verhindert die  
Ausbildung von Konzentrationsgradienten der Partikel innerhalb des  
Probenbehälters.
- die Belichtung mit Sub-Mikrosekunden Blitzen ermöglicht eine  
25 hochauflösende Abbildungen von Kleinstpartikeln bis in den Bereich von  
Sub-Mikrometern.
- es werden von der elektronischen Kamera am Mikroskop eine Anzahl  
von Bildern aus derselben Probensuspension aufgenommen und einer  
automatischen Bildverarbeitung zur Zählung und Charakterisierung der  
30 ausreichend scharf abgebildeten Objekte zugeleitet.
- die mechanisch induzierte Unruhe der Suspension sorgt für schnellen

vollständigen Austausch der Partikel zwischen der scharf abgebildeten Volumenschicht und der Restsuspension im Probenbehälter

- die einzelnen Bilder enthalten durch den mechanisch induzierten Strömungsaustausch repräsentative und unkorrelierte statistische Bilddaten aus der Suspension und jedes Bild trägt damit proportional zur auswertbaren Bilddatenmenge bei.

2. Vorteilhafte Ausgestaltung der Vorrichtung nach Anspruch 1,

gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale:

- eine plane transparente Küvette 5 mit der Suspension wird direkt unter dem Mikroskopobjektiv 5 auf einem Piezo-Ring 6 gehalten, der durch eine externe Wechselspannung 8 in mechanische Schwingungen versetzt wird,
- die Schwingung des Piezokristalls koppelt durch den mechanischen Kontakt an die Küvette an und führt zur ständigen schnellen Bewegung der Partikel und ihrer Durchmischung in der Suspension,
- unterhalb der Küvette befindet sich eine kurz gepulste ( $< 1$  Mikrosekunde) Luminiszenzdiode 7 zur Durchlichtbelichtung.

3. Vorteilhafte Ausgestaltung der Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2,

gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale:

- als Probenbehälter 9 wird ein beispielsweise ein bis zehn Milliliter fassendes Gefäß verwendet, in welches ein hermetisch geschlossener Mikroskoptubus 10 mit gepulster LED-Belichtung 11 taucht
- am Tubusende befindet sich ein optisches Fenster 12, durch welches das Mikroskop in die Suspension 9 einsieht.
- seitlich am Tubusende befindet sich eine gepulste Luminiszenzdiode 11 zur schrägen Durchlichtbelichtung des Mikroskops.
- die Durchmischung der Suspension wird durch einen miniaturisierten Magnetprüher 13 geleistet



Fig 1

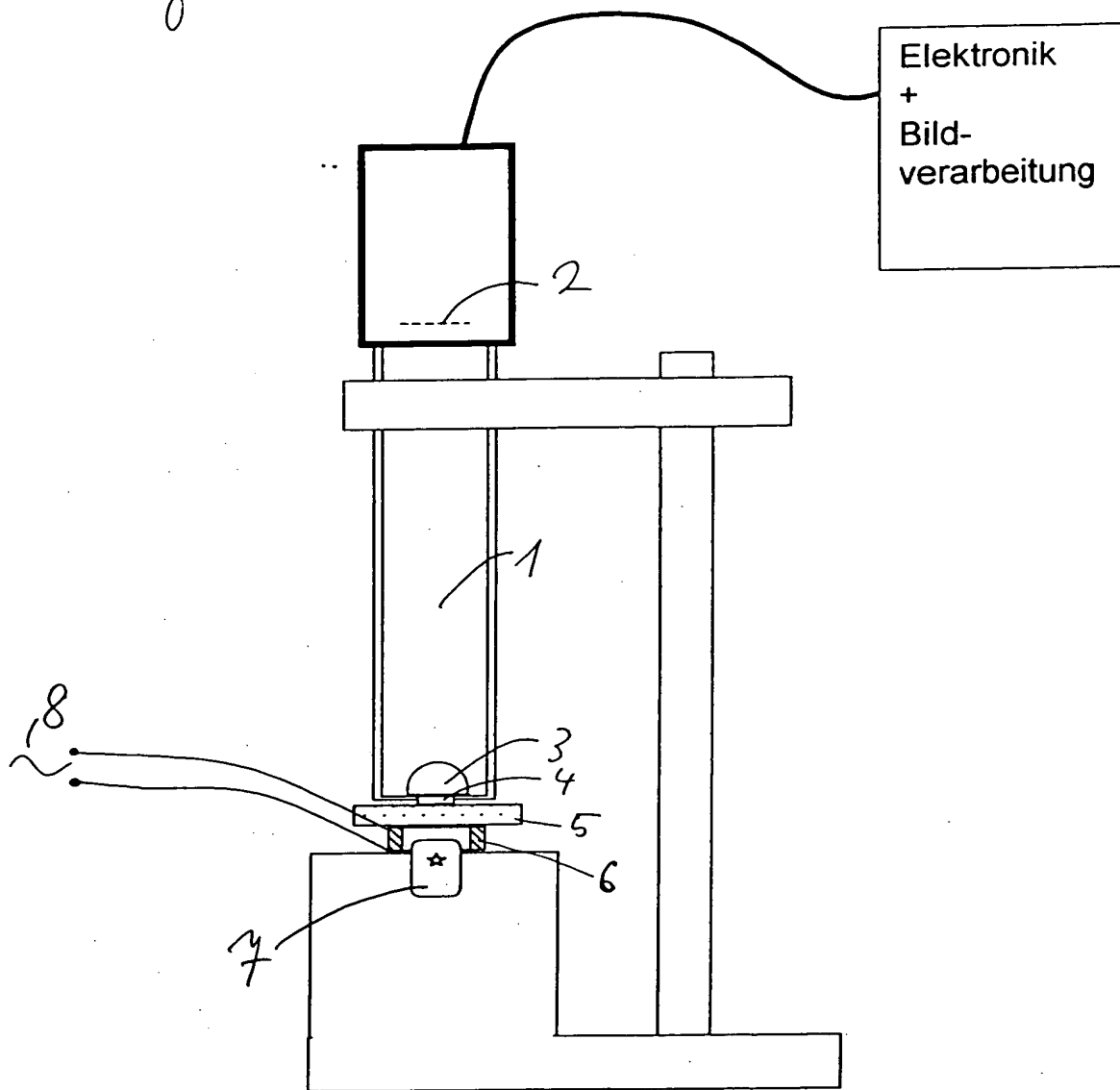


Fig 2

